5 月 May
2019, 62(5): 572 – 577
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.05.005

中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交文库的构建

孙 莉[1,2,#], 岳金金[2,#], 费东亮[2], 李 明[1,2], 马鸣潇[2], 宋铭忻[1,*]

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 锦州医科大学畜牧兽医学院, 辽宁锦州 121001)

摘要:【目的】本研究旨在利用位点特异性重组技术(FullCoV)将中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 幼虫膜蛋白 cDNA 连接到 pPR3-N 载体上,构建中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库。【方法】提取 2 – 3 日龄中华蜜蜂工蜂幼虫总 RNA;分离 mRNA 后,在反转录酶的作用下合成幼虫膜蛋白 cDNA 第 1 链,并合成双链 cDNA。在双链 cDNA 的 5′端加上带有重组序列的接头后,通过 FullCoV 技术与载体 pPR3-N 进行连接,然后将连接产物电转化到 DH10B 感受态细胞,构建中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库,并对该文库插入片段大小和文库滴度进行检测。【结果】通过 FullCoV 技术成功构建了中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库,经检测,中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母 cDNA 文库的总库容量为 1.5×10^7 cfu,文库滴度为 3×10^6 cfu/mL,重组率达到 100%。【结论】本研究利用 FullCoV 技术成功构建了中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母 cDNA 文库,为进一步探究感染中华蜜蜂的病原微生物与宿主蛋白互作研究奠定了基础。

关键词: 中华蜜蜂; cDNA 文库; 滴度; 酵母双杂交; FullCoV 技术; 蛋白质相互作用

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2019)05-0572-06

Construction of a yeast two-hybrid library for membrane proteins of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) larvae

SUN Li[1,2,#], YUE Jin-Jin[2,#], FEI Dong-Liang[2], LI Ming[1,2], MA Ming-Xiao[2], SONG Ming-Xin[1,*]
(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College Animal Husbandry and Veterinary, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract:【Aim】This study aims to construct the yeast two-hybrid cDNA library for membrane proteins of *Apis cerana cerana* larvae by cloning the larval membrane protein cDNA into pPR3-N using FullCoV technique.【Methods】The total RNA was extracted from the 2 – 3 day-old worker larvae of *A. cerana cerana*. After mRNA was isolated, the first strand cDNA of membrane protein was synthesized by reverse transcriptase, and then the double-stranded cDNA was synthesized. After being added to the 5′ end of the double-stranded cDNA, the linker with the recombinant sequence was ligated with the vector pPR3-N by FullCoV technology. The ligation product was electrotransformed into DH10B competent cells to construct the larval membrane protein cDNA library, and the titer of the library and the size of the inserted cDNA fragment were examined and verified.【Results】A yeast two-hybrid cDNA library for membrane proteins of *A. cerana cerana* larvae was successfully constructed by the FullCoV technique. The library had the capacity of 1.5×10^7 cfu, the titer of 3×10^6 cfu/mL, and the recombination rate of

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772760); 锦州医科大学大学生创新训练项目(201828, 201829)

作者简介: 孙莉, 女, 1980 年生, 辽宁营口人, 博士研究生, 副教授, 研究方向为动物疫病, E-mail: lilybaby80@163.com; 岳金金, 女, 1993 年生, 辽宁阜新人, 硕士研究生, 研究方向为微生物学, E-mail: 1462239630@qq.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: songmx@neau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-11-23; 接受日期 Accepted: 2019-02-21

100%.【Conclusion】In this study the yeast two-hybrid cDNA library for membrane proteins of *A. cerana cerana* larvae was successfully constructed using FullCoV technique, which is helpful for the further study on the interaction between pathogen infecting *A. cerana cerana* and host proteins.

Key words: *Apis cerana cerana*; cDNA library; titer; yeast two-hybrid; FullCoV technology; protein-protein interaction

在病毒感染宿主过程中或宿主抵抗病毒感染的免疫防御过程中，蛋白间具有极其重要的相互作用，且通过研究蛋白间互作的机制有助于对未知功能基因的分析（袁维峰等，2009）。1989 年 Fields 等首次提出来的酵母双杂交系统（yeast two-hybrid system，Y2H）是用来研究蛋白之间的相互作用，该系统是利用诱饵蛋白和猎物蛋白相互作用的报告基因，判断特定蛋白之间有无相互作用（Yanatori *et al.*，2015）。目前已成功用于研究蛋白的互作，如用在筛选猪外周血单个核细胞 cDNA 文库中，共筛选到与猪瘟病毒 E2 蛋白相互作用的 17 个宿主蛋白（廖亚金等，2013），在昆虫痘病毒中利用酵母双杂交系统确定了痘病毒蛋白与病毒蛋白激酶的相互作用（Danismazoglu *et al.*，2018）等，然而，在 Y2H 系统中由于细胞核内融合蛋白通过相互作用而激活转录，蛋白质必须是可溶形式的蛋白质，蛋白质相互作用必须发生在酵母细胞核内，膜蛋白之间的互作不适合在 Y2H 系统中进行研究（Ivanusic *et al.*，2015），鉴于此，瑞士 Dualsystems Biotech AG 公司开发了基于分离的泛素系统（split-ubiquitin）介导的膜蛋白酵母双杂交系统（DUAL membrane starter kit）。分离的泛素系统采用分子生物学的手段可以将泛素断裂为两部分：含 C 端的部分（Cub）和含 N 端的部分（Nub），在体内 Cub 和 Nub 可以自发结合，形成泛素，即断裂泛素（Li *et al.*，2017）。当泛素 N 端的第 13 位异亮氨酸突变成甘氨酸，在体内 Cub 和 NubG 将不能发生正确的折叠无法重新形成泛素，但是当 C 端和 N 端各自连接一个已知蛋白，若这两个已知蛋白之间存在着相互作用时，Cub 和 Nub 又可以发生结合重新形成断裂泛素（Wang *et al.*，2004；Kittanakom *et al.*，2009；Yasuyuki *et al.*，2013；Ivanusic *et al.*，2015），利用泛素的这一特点，把蛋白 A 与 Cub 进行融合，并在 C 端再融合一个转录因子（TF），把蛋白 B 与 Nub 进行融合。如果 A 蛋白和 B 蛋白之间存在相互作用，就可以使 Cub 和 Nub 两部分重新正确折叠形成断裂泛素，与 Cub 的 C 端相连的 TF 能够被泛素特异性的蛋白酶识别而被切割下来进入细胞核内，从而激活报告基因（Marik *et al.*，2016），进而判断 A 蛋白和 B 蛋白之间是否存在相互作用。为此，基于分离的泛素介导的 DUAL 可以简便、快速、特异地用于检测膜蛋白之间的相互作用（Memišević *et al.*，2015；Cox *et al.*，2016；Martin *et al.*，2017），无需核定位信号、且泛素蛋白对具有相互作用的蛋白的影响很小，能够在与生理环境更相似的条件下进行膜蛋白与膜蛋白、膜蛋白与可溶性蛋白之间相互作用研究（Bashline and Gu，2014；Indriolo and Goring，2016；Li *et al.*，2016）。此外，因为诱饵蛋白和猎物蛋白之间的相互作用发生在细胞质或细胞膜而不是细胞核中，所以它提供了比 Y2H 系统更多更具体的受体蛋白。目前基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交技术已广泛用于病原体与宿主细胞受体蛋白相互作用的研究中，如肺炎衣原体 CPj0783 蛋白与人 Huntingtin-protein14 蛋白互作（Snider and Stagljar，2016），痢疾杆菌的 IpaC 蛋白与人胶原酶蛋白互作（Petschnigg *et al.*，2012）等研究。

蜜蜂为膜翅目（Hymenoptera）蜜蜂科（Apidae）昆虫的统称，其中蜜蜂属 *Apis* 的东方蜜蜂 *Apis cerana*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和黑小蜜蜂 *Apis andreniformis* 等 9 个蜂种对于人类生产生活有着重要意义。蜜蜂作为经济动物，不但为人类提供丰富蜂产品，而且为虫媒植物授粉，对提高农作物产量和质量起到不可替代的作用。据统计，世界上约三分之一的农作物依靠蜜蜂授粉，全球昆虫授粉的经济价值估计为 2 120 亿美元/年，相当于世界农业生产总值的 9.5%（Tantillo *et al.*，2015）。然而近年来，由于蜂病毒病的广泛流行，特别是中蜂囊状幼虫病毒（Chinese sacbrood virus，CSBV）在全国范围内广泛流行，已经严重威胁养蜂业的发展（颜珣和韩日畴，2008；Liu *et al.*，2010），一旦发生就会对中蜂业造成毁灭性打击。CSBV 主要感染 2－3 日龄的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 幼虫，感染幼虫头部向上弯曲且形状特别尖，虫体中聚集淡黄色或白色液体，患病幼虫表皮不能蜕去，体色由纯白色渐变为淡黄色，最后呈深褐色，直致幼虫死亡；成年蜜蜂感染虽无明显临床症状，但缩短蜜蜂寿命，降低蜜蜂采蜜能

力和飞翔能力等(Berényi *et al.*, 2006; Ma, 2014)。然而目前对 CSBV 致病机理研究和中华蜜蜂抗 CSBV 免疫研究鲜有报道,鉴于此,本研究构建了中华蜜蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交文库,为蜂病毒致病机理和免疫机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试样品

健康中华蜜蜂 2－3 日龄工蜂幼虫收集于锦州医科大学实验动物中心养殖基地,该基地环境良好,蜜源充足,满足蜜蜂生活需求。

1.2 主要试剂和仪器

Oligotex mRNA Kits 购自 Qiagen; DEPC 水购自 Beyotime; 1 kb Plus DNA Ladder 和 UltraPure Agarose 购自上海海科生物;各型号 Tip 和离心管购自 Axygen; Supscript Double Strand cDNA Kit 和 RT 酶购自 Invitrogen; Trimmer-2 cDNA Normalization Kit 购自 Evrogen; UltraPure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl: Alcohol (25:24:1, v/v)购自 Sigma; DH10B 感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司。

超净工作台和 －80℃超低温冰箱购自中国海尔公司;台式高速冷冻离心机和移液器购自 Eppendorf;PCR 仪购自 Bio-Rad;电转化仪购自 Bio-Rad。

1.3 总 RNA 提取

收集中华蜜蜂工蜂幼虫样本,使用 Trizol 法提取总 RNA。加入 20 mL Trizol,振荡混匀,25℃放置 5 min 后加入 4 mL 酚-氯仿(酚: 氯仿 =1:1, v/v),振荡混匀,4℃ 12 000 g 离心 10 min。吸取上清加入等量异丙醇,振荡混匀后,4℃ 12 000 g 离心 15 min,弃上清。75% 乙醇 5 mL 洗涤 2 次,风干后溶于 500 μL DEPC 水。对总 RNA 进行质量检测。

1.4 mRNA 的分离

细胞 mRNA 的分离按 Oligotex mRNA Kits 的说明书进行。将 1.3 节合成的总 RNA 转移到无 RNA 酶的 EP 管中,补足体积至 500 μL,加入等体积 70℃预热 OBB 混匀后,70℃水浴 3 min,然后立即置于 25℃静置 10 min 后,在等温条件下,14 000 g 离心 2 min,弃去上清。然后加入 400 μL OW2 重悬沉淀,轻轻混匀,转移到 1.5 mL 离心柱上,14 000 g 离心 1 min 后,将离心柱置于新 1.5 mL EP 管内,然后加入 100 μL 70℃温浴的 DEPC 水,重复洗脱 1 次后,将两次洗脱液混合后加 600 μL 无水乙醇和 60 μL 2 mol/L 乙酸钠,颠倒混匀后 －80℃放置 15 min 后,进行离心沉淀、洗涤、自然风干后,加入 8 μL DEPC 水溶解沉淀,取 1 μL 电泳检测以及测 OD 值。

1.5 cDNA 第 1 链的合成

在 0.2 mL 无 RNA 酶的小管中将 1.4 节分离得到的样品 mRNA 补 DEPC 水体积至 22.5 μL,加入 3′ RT Primer (1.5 μg/μL) 2 μL 后,70℃放置 7 min,立即进行冰浴。同时在一个新的 0.2 mL 无 RNA 酶的小管中依次加入 5 × RT Buffer 10 μL, 水 5 μL, dNTPs(10 mmol/L) 2.5 μL 和 RT 酶 5 μL 配制 cDNA 第 1 链反应体系,并置于冰上待用;引物反应管温度降至 45℃后孵育 2 min,加入 cDNA 第 1 链反应体系混匀,避免产生气泡;混匀后置于 50℃孵育 60 min。反应产物移入新的 1.5 mL 无 RNA 酶的 EP 管中,加入糖原(20 μg/μL) 1 μL, NH_4OAc (7.5 mol/L) 25 μL, 100% 乙醇 187 μL 充分混匀,－80℃放置 1 h 以上。4℃ 16 000 g 离心 30 min,弃上清。加入无 RNA 酶的 70 % 乙醇 150 μL, 16 000 g 4℃离心 3 min,弃去上清,重复此步骤一次。室温干燥 cDNA,用 66 μL DEPC 水溶解沉淀,冰上放置备用。

1.6 cDNA 第 2 链的合成及加 5′接头

在 1.5 节反应液中依次加入 92 μL DEPC 水, 30 μL 5 × Second Strand Buffer, 3 μL dNTPs (10 mmol/L), 1 μL DNA Ligase (10 U/μL), 4 μL DNA Polymerase I 1 μL RNaseH (2 U/μL), 16℃ 2 h 后,加入 T4 DNA Polymerase 2 μL, 16℃ 5 min 后,加入 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 10 μL,加入酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1, v/v) 160 μL,充分混匀 30 s;室温 14 000 g 离心 5 min,小心将上清取到新的离心管中,乙醇沉淀,溶于 34 μL DEPC 水中。

cDNA 第 2 链合成后,按照以下反应体系加 5′接头,依次加入 34 μL cDNA (0.15 μg/μL), 5 μL 10 × T4 Ligase Buffer, 1 μL T4 DNA Ligase (40 U/μL, NEB)和 10 μL 5′ Adapter (1 μg/μL)混匀后置于 16℃,孵育 16 ~24 h,加入 2 μL dNTP (10 mmol/L), 2 μL T4 DNA 聚合酶, 16℃孵育 20 min, 补平末端。

1.7 文库构建及其鉴定

1.7.1 目的 cDNA 回收及其与载体的连接: 使用 1% 浓度的低熔点琼脂糖胶将 1 kb 以上 cDNA 片段溶于 14 μL 的 DEPC。将 7 μL 的 cDNA 分别与 3 μL 的经酶切处理线性化的 pPR3-N(膜蛋白酵母双杂交)载体(Biovector)混合,加入 5 μL Infusion 重组酶,以及 5 μL 水,混匀,50℃孵育 1 h。然后在上述

产物中加入 2 μL 灭活的蛋白酶 K（proteinase K），再加入 78 μL 无菌水，使得总体积为 100 μL，再依次加入糖原（20 μg/μL）1 μL，7.5 mol/L NH_4OAc 50 μL，100% 乙醇 375 μL，混合均匀并置于 −80℃ 1 h 以上，4℃ 16 000 g 离心 30 min，小心弃去上清。用 70% 乙醇洗涤 cDNA 沉淀，25℃ 风干后溶于 10 μL DEPC 水进行冰浴。

1.7.2　电转化至 DH10B 感受态细胞：将 1 mm 电转杯（Bio-Rad）置于 −80℃ 预冷 30 min，将电转杯置于冰上后，加入 2.5 μL 1.7.1 节重组产物 2.5 μL 和 50 μL DH10B 感受态细胞，混匀后冰浴 45 min。使用电转化仪（Bio-Rad）进行电击，然后立即向电转杯内加入 1 mL 液体 LB，合并 4 次转化的菌液，用液体 LB 补足体系至 5 mL 后，将其转移至新的 15 mL 离心管中，置于 37℃ 225～250 r/min 振荡培养 1 h 以上。振荡结束后，将其以 10，100，1 000 和 10 000倍进行稀释，分别取 10 μL 涂于平板上，剩余培养物可 4℃ 冰箱放置过夜或加入甘油存于 −80℃ 冰箱。

1.7.3　库容量及插入片段的检测：将 10 μL 转化后的菌液进行 1 000 倍稀释，取 10 μL 涂布于含 Amp 的 LB 平板上，12 h 后进行计菌落数。

库容量的计算：文库滴度（cfu/mL）= 平板上的菌落数/10 μL × 1 000 倍 × 1 × 10^3 μL；总库容量（cfu）= 文库滴度 × 文库菌液总体积（mL）。

插入片段大小的检测：挑取固体平板上的单克隆，进行 PCR 检测，电泳检测 PCR 产物的片段大小。

2　结果

2.1　中华蜜蜂工蜂幼虫总 RNA

从收集的中华蜜蜂工蜂幼虫体内提取的总 RNA，经 1% 甲醛变性凝胶电泳检测（图 1），5S，18S 和 28S rRNA 的条带清晰可见，说明所提取中华蜜蜂幼虫的总 RNA 未降解。通过核酸蛋白检测仪测定的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.95，OD_{260}/OD_{230} 为 1.89，其浓度为 139.4 ng/μL，表明总 RNA 样品纯度较高，可作为反转录的模板。

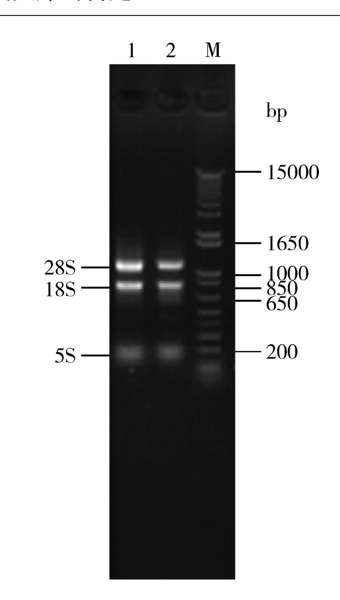


图 1　中华蜜蜂工蜂幼虫的总 RNA

Fig. 1　Total RNA of *Apis cerana cerana* worker larvae

1，2：样品总 RNA（Total RNA of sample）；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

2.2　中华蜜蜂工蜂幼虫 mRNA

分离得到的中华蜜蜂工蜂幼虫 mRNA 总量为 5.6 μg，电泳检测结果如图 2 所示，mRNA 条带清晰，呈弥散状分布，条带分布均匀，完全满足建库需要。

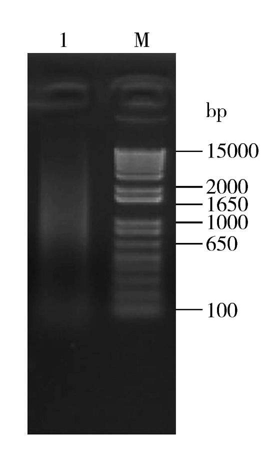


图 2　中华蜜蜂工蜂幼虫 mRNA

Fig. 2　mRNA of *Apis cerana cerana* worker larvae

1：mRNA；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

2.3　中华蜜蜂工蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交文库滴度

取文库菌液 10 μL 进行 100 倍稀释，取 10 μL 涂于固体培养基上，所构建的 cDNA 文库平板菌落统计结果共长了约 300 个克隆子，如图 3 所示。经计算，文库滴度为 3 × 10^6 cfu/mL。共计 5 mL 的转化后原始菌液，则总库容量为 1.5 × 10^7 cfu。

2.4　中华蜜蜂工蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库重组率

随机挑取 24 个阳性单克隆进行 PCR 扩增，结果如图 4 所示，插入片段分布均匀，从电泳图来看，平均插入片段大于 1 200 bp，平均长度在 1 500 bp 左右，24 个单克隆的 PCR 产物电泳泳道中无空白，因此文库的重组率为 100%，文库指标合格。

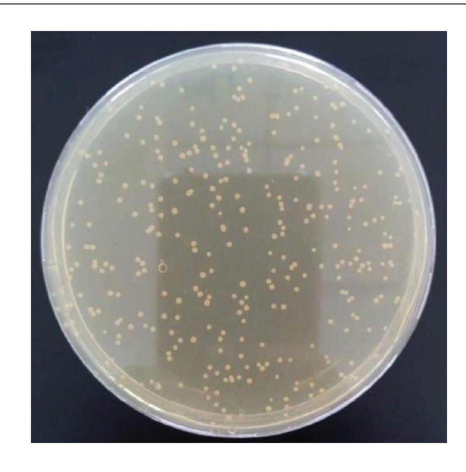


图 3 中华蜜蜂工蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交文库电转化菌涂板后的生长情况

Fig. 3 Electroporation bacteria growth after plating of yeast two-hybrid library for membrane proteins of *Apis cerana cerana* worker larvae

菌液涂 LB 固体培养基后共长了约 300 个克隆子。Approximately 300 clones were grown in LB solid media.

3 讨论

CSBV 是当前危害中华蜜蜂的首要病毒性病原,一旦发生,会给中华蜜蜂业带来毁灭性灾害,但目前研究 CSBV 与宿主细胞受体蛋白相互作用的关系及其可能的致病机制仍不清楚,严重限制了针对病毒入侵过程来设计新型抗病毒药物。魏东(2017)曾构建了中华蜜蜂幼虫酵母 cDNA 文库,利用 Y2H 系统筛选与 CSBV 互作的宿主蛋白,但并没有筛选到有意义的膜蛋白。基于此,本研究利用基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统构建了中华蜜蜂工蜂幼虫的 cDNA 文库,为研究 CSBV 与宿主蛋白互作,进而探讨 CSBV 致病机制等研究奠定基础。本研究中提取的 2－3 日龄中蜂工蜂幼虫总 RNA 中 5S, 18S 和 28S rRNA 的条带清晰可见,总 RNA 无降解, 且完整,用核酸蛋白检测仪测定的

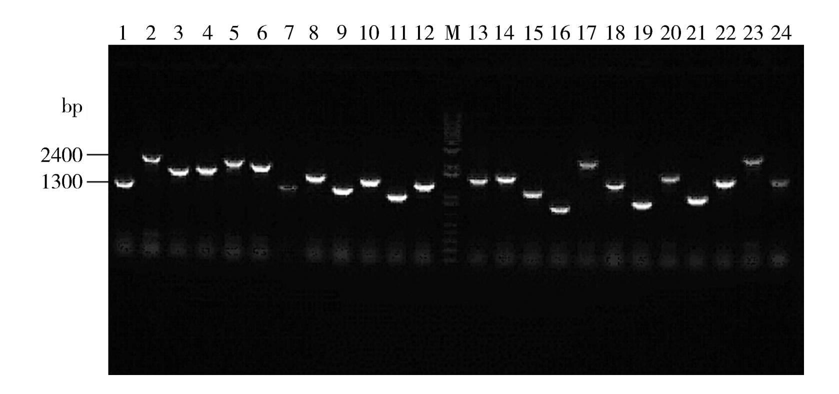


图 4 中华蜜蜂工蜂幼虫膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库重组率及插入片段鉴定

Fig. 4 Recombination rate and identification of inserted fragment of yeast two-hybrid cDNA library for membrane proteins of *Apis cerana cerana* worker larvae

1－24: cDNA 文库中插入的片段 Inserted fragment in cDNA library; M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

OD_{260}/OD_{280} 为 1.95, OD_{260}/OD_{230} 为 1.89,其浓度为 139.4 ng/μL,总 RNA 样品纯度较高可作为反转录的模板,mRNA 总量为 5.6 μg,mRNA 条带清晰,呈弥散状分布,条带分布均匀,质量合格,mRNA 的量可以满足建库需要。在此基础上,本研究应用同源重组的方式将合成的 cDNA 与经酶切处理线性化的 pPR3-N 载体进行连接,由于线性化的 DNA 两端与基因组 DNA 的多处序列具有同源性(Du *et al*., 2015),因而后续的重组连接更准确。该重组连接方法的优点是步骤相对简单,克服了其连接效率低的缺点,从而大大提高了文库质量,且方便今后将该文库样本构建到任何其他载体上。

研究表明,人 *Homo sapiens*、大鼠 *Rattus norvegicus*、小鼠 *Mus musculus* 等动物样本基因数在 5×10^4 cfu/mL 左右,文库至少 100 倍覆盖,即库容量需要达到 5×10^6 cfu/mL 以上;研究比较多的植物样本水稻 *Oryza sativa* 基因数量为人的 2～3 倍,覆盖 100 倍的基因数,则库容量需要达到 1×10^7 cfu/mL 以上,所以文库的平均滴度在 $5\times10^6\sim1\times10^7$ cfu/mL 之间,则表明文库的质量较好。本研究中构建的 cDNA 文库的库容达到了总库容量为 1.5×10^7 cfu,且本研究中构建的文库具有很高的重组率和随机性,因此,本研究成功构建了基于分离泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统的中华蜜蜂幼虫膜蛋白 cDNA 文库,为进一步研究 CSBV 与宿主细胞的相互作用,阐明 CSBV 感染宿主细胞的致病机制奠定了实验基础。

参考文献（References）

Bashline L, Gu Y, 2014. Using the split-ubiquitin yeast two-hybrid system to test protein-protein interactions of transmembrane proteins. *Meth. Mol. Biol.*, 1242: 143–158.

Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N, 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4): 2414–2420.

Cox C, McKenna JP, Watt AP, Coyle PV, 2016. Urea plasma parvum and mycoplasma genitalium are found to be significantly associated with microscopy-confirmed urethritis in a routine genitourinary medicine setting. *Int. J. STD AIDS*, 27(10): 861–867.

Danismazoglu M, Nalcacioglu R, Muratoglu H, Demirbag Z, 2018. The protein-protein interactions between *Amsacta moorei entomopoxvirus* (AMEV) protein kinases (PKs) and all viral proteins. *Virus Res.*, 248: 31–38.

Du W, Xia J, Zang Y, Liu MJ, Li HB, Yan XM, Zhang JS, Li N, Zhou ZY, Xie XZ, 2015. Expression of recombinant myostatin propeptide pPIC9K-Msp plasmid in *Pichia pastoris*. *Genet. Mol. Res.*, 14(4): 18414–18420.

Indriolo E, Goring DR, 2016. Yeast two-hybrid interactions between *Arabidopsis lyrata* S Receptor Kinase and the ARC1 E3 ligase. *Plant Signa. Behav.*, 11(6): e1188233.

Ivanusic D, Heinisch JJ, Eschricht M, Laube U, Denner J, 2015. Improved split-ubiquitin screening technique to identify surface membrane protein-protein interactions. *BioTechniques*, 59(2): 63–73.

Kittanakom S, Chuk M, Wong V, Snyder J, Edmonds D, Lydakis A, Zhang Z, 2009. Analysis of membrane protein complexes using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid (MYTH) system. *Methods Mol. Biol.*, 548: 247–271.

Li J, Gao J, Han L, Zhang Y, Guan W, Zhou L, Yu Y, Han W, 2016. Development of a membrane-anchored ligand and receptor yeast two-hybrid system for ligand-receptor interaction identification. *Sci. Rep.*, 6: 35631.

Li QP, Wang S, Gou JY, 2017. A split ubiquitin system to reveal topology and released peptides of membrane proteins. *BMC Biotechnol.*, 17(1): 69.

Liao YJ, Li S, He F, He WR, Dong H, Feng S, Sun Y, Qiu HJ, 2013. Construction of cDNA expression library of porcine peripheral blood mononuclear cells and screening of cell proteins interacting with classical swine fever virus E2 protein. *Chin. J. Prev. Veter. Med.*, 35(9): 707–710. [廖亚金, 李素, 贺番, 何文瑞, 董泓, 冯硕, 孙元, 仇华吉, 2013. 猪外周血单个核细胞 cDNA 酵母表达文库的构建及与猪瘟病毒 E2 蛋白相互作用细胞蛋白的筛选. 中国预防兽医学报, 35(9): 707–710]

Liu X, Zhang Y, Yan X, Han R, 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Curr. Microbiol.*, 61(5): 422–428.

Ma M, 2014. New insights of sacbrood virus. *Virol. Sin.*, 29(6): 410–413.

Marik A, Naiya H, Das M, Mukherjee G, Basu S, Saha C, Chowdhury R, Bhattacharyya K, Seal A, 2016. Split-ubiquitin yeast two-hybrid interaction reveals a novel interaction between a natural resistance associated macrophage protein and a membrane bound thioredoxin in *Brassica juncea*. *Plant Mol. Biol.*, 92(4–5): 519–537.

Martin DH, Manhart LE, Workowski KA, 2017. Mycoplasma genitalium from basic science to public health: summary of the results from a national institute of allergy and infectious diseases technical consultation and consensus recommendations for future research priorities. *J. Infect. Dis.*, 216(Suppl_2): S427–S430.

Memišević V, Zavaljevski N, Rajagopala S, Kwon K, Pieper R, Deshazer D, Reifman J, Wallqvist A, 2015. Mining host-pathogen protein interactions to characterize *Burkholderia mallei* infectivity mechanisms. *PLoS Comp. Biol.*, 11(3): e1004088.

Petschnigg J, Wong V, Snider J, Stagljar I, 2012. Investigation of membrane protein interactions using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Methods Mol. Biol.*, 812: 225–244.

Snider J, Stagljar I, 2016. Membrane yeast two-hybrid (MYTH) mapping of full-length membrane protein interactions. *Cold Spring Harb. Protoc.*, (1): pdb. top077560.

Tantillo G, Bottaro M, Pinto AD, Vito M, Pietro DP, Valentina T, 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Ital. J. Food Saf.*, 4(3): 5364.

Wang B, Pelletier J, Massaad MJ, Herscovics A, Shore GC, 2004. The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.*, 24(7): 2767–2778.

Wei D, 2017. Construction of Yeast Two-hybrid cDNA Library for *Apis cerana* Larvae and Screening Its Interaction Protein with VP3 of Sacbrood Virus. MSc Thesis, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning. [魏东, 2017. 中蜂幼虫酵母双杂交文库构建及其与囊状幼虫病毒 VP3 互作蛋白筛选. 辽宁锦州: 锦州医科大学硕士学位论文]

Yan X, Han RC, 2008. Diagnostic technologies of common pathogens of honeybees in China. *Chin. Bull. Entomol.*, 45(3): 483–488. [颜珣, 韩日畴, 2008. 我国蜜蜂主要病原检测技术. 昆虫知识, 45(3): 483–488]

Yanatori I, Yasui Y, Ouchi K, Kishi F, 2015. *Chlamydia pneumoniae* CPj0783 interaction with Huntingtin-protein14. *Int. Microbiol.*, 18(4): 225–233.

Yasuyuki N, Jun I, Akihiko K, 2013. Rapid, facile detection of heterodimer partners for target human G-protein-coupled receptors using a modified split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *PLoS ONE*, 8(6): e66793.

Yuan WF, Wu BM, Zhang XY, Zhang Q, Sun HC, 2009. Preliminary screening of IBDV VP2-binding protein by yeast two-hybrid system. *Acta Veter. Zootech. Sin.*, 40(6): 958–962. [袁维峰, 吴保明, 张鑫宇, 张泉, 孙怀昌, 2009. 应用酵母双杂交系统初步筛选 IBDV VP2 结合蛋白. 畜牧兽医学报, 40(6): 958–962]

（责任编辑：马丽萍）